



Influência dos antioxidantes na regeneração óssea

Bruno Samuel Azevedo da Silva Carvalho

Monografia de investigação ou Relatório de Atividade Clínica

Mestrado Integrado de Medicina Dentária

Influência dos antioxidantes na regeneração óssea

Artigo de Revisão Bibliográfica

Bruno Samuel Azevedo da Silva Carvalho

abrunoc1@sapo.pt



Orientador: Professor Doutor João Miguel Silva e Costa Rodrigues

Porto, Maio de 2013

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais o estímulo e força que me deram para lutar pelos melhores resultados e toda a dedicação e paciência que sempre tiveram comigo.

Agradeço à minha irmã por toda a inspiração e amizade.

Agradeço ao meu orientador pela fundamental colaboração na obtenção de conhecimentos para elaboração do meu trabalho.

Agradeço à Dra. Alzira pelo importante apoio dado ao longo da minha carreira académica.

Agradeço ao Carlos pela importante ajuda na tradução de partes do meu trabalho.

Agradeço a todos os amigos e colegas pela amizade e companheirismo.

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Material e Métodos	4
Tecido ósseo	5
ROS e Antioxidantes	8
Osteoporose	9
Vitamina E	10
Vitamina C	12
Flavonoides	14
Carotenoides	17
Conclusão	19
Referencias Bibliográficas	20
Anexos	36

Resumo

Os antioxidantes são substâncias naturais que podem limitar as lesões causadas pelos radicais livres. O organismo utiliza estas substâncias para estabilizar e/ou neutralizar os radicais livres, impedindo-os de causar danos nas estruturas celulares, já que eles podem proteger e reverter os danos causados pela oxidação das biomoléculas. A origem destes danos pode ser endógena (formação no próprio organismo), ou exógena (ingestão na dieta), podendo apresentar-se como enzimáticos e não enzimáticos. O processo de regeneração óssea é extremamente complexo, envolvendo a ação coordenada de vários tipos celulares, com especial destaque para os osteoblastos e os osteoclastos. Há estudos que sugerem que existe uma relação entre a presença de antioxidantes e o metabolismo ósseo.

A vitamina E é um agente natural de origem biológica com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que pode funcionar como fator estimulador da proliferação e maturação dos osteoblastos, protegendo as células dos efeitos prejudiciais dos radicais livres.

A vitamina C (ácido ascórbico) é uma vitamina solúvel em água que tem como principal função atuar como antioxidante, eliminando, de forma eficiente, o anião superóxido, peróxido de hidrogénio, hipoclorito, radicais hidroxilo, radicais peróxido, protegendo desta forma as membranas celulares dos danos dos radicais livres.

Os flavonoides são uma classe de metabolitos secundários de plantas, que compreendem as flavonas, isoflavonoides e neoflavonoides e têm como uma das principais funções a proteção contra o stresse oxidativo nas células.

Os carotenoides encontram-se em legumes e frutas e podem ser divididos em carotenos e xantofilas, sendo que alguns são os precursores da síntese da vitamina A em animais. São antioxidantes com várias funções fisiológicas, havendo vários estudos que sugerem um efeito de alguns carotenoides ao nível do metabolismo ósseo.

Pode concluir-se que alguns antioxidantes apresentam um potencial efeito positivo no metabolismo ósseo, apesar dos mecanismos subjacentes não estarem ainda completamente caracterizados.

Palavras-chave: Osteoblasto; osteoclasto; ROS; antioxidantes vitamina E; vitamina C; ácido ascórbico; genisteína; flavonoides; carotenoides.

Abstract

Antioxidants are natural substances which can limit the damages caused by free radicals. The body uses these substances to stabilize and/or neutralize the free radicals, preventing them from causing damage to the cellular structures, since they can protect and reverse the damages caused by the oxidation of the biomolecules. The origin of these damages can be either endogenous (generated from within the system) or exogenous (due to dietary intake) and fall under the categories of enzymatic or non-enzymatic. The bone regeneration process is extremely complex. It involves the coordinated action of several cell types, with a strong emphasis on osteoblasts and osteoclasts. Studies suggest that there is a link between the presence of antioxidants and bone metabolism.

Vitamin E is a natural biological agent with antioxidant and anti-inflammatory properties and can stimulate the proliferation and maturation of osteoblasts, thus protecting cells from the harmful effects of free radicals.

Vitamin C (ascorbic acid) is a water-soluble vitamin whose main function is to act as an antioxidant. It effectively eliminates the superoxide anion, hydrogen peroxide, hypochlorite, hydroxyl radicals and peroxide radicals, thus, protecting cell membranes from the damage caused by free radicals.

Flavonoids are a class of plant secondary metabolites, which include flavones, isoflavones and neoflavones, and one of their main functions is to protect cells from oxidative stress.

Carotenoids are found in vegetables and fruits and may be divided into carotenes and xanthophylls. Some of them are the precursors of the synthesis of vitamin A in animals. They are antioxidants with multiple physiological functions and, in fact, several studies have suggested that certain carotenoids have an effect on bone metabolism.

It can be concluded that certain antioxidants present a potential positive effect on bone metabolism, in spite of the fact that the underlying mechanisms are not yet fully characterized.

Keywords: Osteoblast; Osteoclast; ROS; Antioxidants; Vitamin E; Vitamin C; Ascorbic Acid; Genistein; Flavonoids; Carotenoids.

Introdução

Os radicais livres são moléculas instáveis, uma vez que os seus átomos possuem um número ímpar de eletrões. Para atingir a estabilidade, os radicais livres reagem com outras moléculas de forma a adquirirem um eletrão. São, por isso, moléculas altamente reativas e potencialmente perigosas para as nossas células, pois podem transformar moléculas estáveis em moléculas instáveis.¹ Ao nível dos seres vivos, as espécies reativas de oxigénio (ROS) representam a classe de radicais livres mais importantes, tendo sido estudado principalmente os que têm origem principalmente em mitocôndrias, apesar de que também podem ter origem nas NADPH oxidases, citocromo P-450, ciclo-oxigenases, aldeído oxidase, diidroorotato desidrogenase, triptofano dioxigenase entre outros.² A produção de ROS é aumentada pelo envelhecimento e pela deficiência em estrogénio, o que, por norma, leva a um estado osteoporótico.³ Portanto, é vital o conhecimento médico do processo, de forma a obterem-se formas de inibir a sua formação para combater as patologias do osso, nomeadamente a osteoporose. Assim sendo, o organismo possui formas de combater esta ação nefasta das ROS com a utilização de mecanismos de reparação, ou então, pelas defesas antioxidantes, as quais são substâncias naturais que podem limitar as lesões causadas pelos radicais livres. O organismo utiliza, então, estas substâncias para estabilizar e/ou neutralizar aqueles radicais, impedindo-os de causar danos nas estruturas celulares. Assim, os antioxidantes podem proteger e reverter os danos causados pela oxidação. A origem destes antioxidantes pode ser endógena (formação no próprio organismo), ou exógena (ingestão na dieta), apresentando-se como enzimáticos e não enzimáticos. Como exemplo de antioxidantes enzimáticos, existem a superóxido dismutase (SOD), a calase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx).⁴ Ao nível dos antioxidantes não enzimáticos, existe o ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenoides, flavonoides, tióis entre outros. Alguns alimentos, ricos em antioxidantes, incluem frutas e vegetais que são ricos em vitaminas A, C e E, beta-caroteno, luteína, licopeno e selénio.⁵

Desde há alguns séculos, têm sido realizadas muitas tentativas e colocadas em hipótese um grande número de teorias para explicar o processo conducente à regeneração óssea. Através de muitas experiências, vários autores tentaram compreender e, posteriormente, controlar os eventos fisiológicos que permitem a consolidação óssea. Entre os séculos XVIII e XIX houve mudanças significativas na área, e, embora com o mundo científico bastante cético, surgiram novas ideias no campo da cirurgia óssea. A principal causa destas investigações é a necessidade de recuperar do estado deficiente que, por exemplo, a realização de amputações deixa nos pacientes. O processo

de regeneração óssea é extremamente complexo e envolve a ação coordenada de vários tipos celulares, com especial destaque para os osteoblastos e os osteoclastos. Há estudos que sugerem que existe uma relação entre a presença de antioxidantes e o metabolismo ósseo.⁶ Assim, pensa-se que os antioxidantes poderão ter um efeito benéfico na saúde do osso o que tem sido demonstrado em diversos estudos que relatam o efeito protetor e indutor de formação óssea pela interação direta ou indireta com os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.⁷ No entanto, esses efeitos são muitas vezes contraditórios ou obtidos em modelos experimentais diversos. Como tal, este trabalho tem como objetivo reunir a informação que existe sobre o papel dos antioxidantes na regeneração óssea.

Material e métodos

O presente estudo foi realizado baseando-se numa pesquisa em computador utilizando as bases de dados online PubMed/MEDLINE e ScienceDirect. De forma a garantir a correta inclusão dos artigos relevantes foram utilizadas referências bibliográficas. No estudo, foram incluídos os artigos que demonstravam o caráter positivo dos antioxidantes na regeneração óssea. Como critérios de exclusão, não foram utilizados artigos escritos noutra língua que não a Inglesa e/ou também que não se relacionassem com a ação direta dos antioxidantes no metabolismo ósseo.

Tecido ósseo

O osso fornece um suporte mecânico para as articulações, tendões e ligamentos, protege os órgãos vitais e age como um reservatório de cálcio e fosfato na preservação da hemóstase mineral normal. É um tecido complexo e dinâmico que se renova e repara, durante toda a vida, através de um processo designado de remodelação óssea.⁸ O tecido ósseo é composto por uma matriz orgânica reforçada por depósitos de fosfato de cálcio. O colagénio tipo I constitui aproximadamente 95% da matriz orgânica, os restantes 5% são compostos por proteoglicanos e glicoproteínas (osteocalcina, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento). A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea e é constituída por fosfato, cálcio, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. Quanto aos sais cristalinos depositados na matriz orgânica do osso, estes são principalmente o cálcio e o fosfato que formam cristais com estrutura de hidroxiapatite.⁹

Existem dois tipos de osso, o cortical e o esponjoso (cerca de 80% do tecido ósseo total). O osso cortical é denso, envolvendo, como uma espécie de envelope, a zona medular. É constituído por fibrilas de colagénio e é formado a partir de sistemas de Havers. Já o osso esponjoso, de forma porosa, tem uma matriz pouco organizada, apresentando uma menor densidade e uma maior área de superfície. Este tipo de osso ocupa a matriz dos ossos longos, ossos planos e das vértebras. Pode dizer-se que é uma malha de interligação de trabéculas ósseas separadas por espaços preenchidos por medula óssea. Em termos funcionais, o osso cortical promove uma atividade mecânica e protetora, enquanto o osso esponjoso tem essencialmente funções metabólicas.¹⁰

Em termos celulares, o osso é constituído por diferentes tipos de células, nomeadamente, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, que estão intimamente relacionados entre si.⁹ Os osteoblastos são células totalmente diferenciadas, intensamente basófilas, o que indica a presença de proteínas ribonucleicas relacionadas com a síntese dos componentes da matriz óssea. Por norma, os osteoblastos localizam-se em duas áreas próximas da superfície do osso onde depositam a matriz óssea, estando associados ao processo da osteogénese.¹¹ Os osteoblastos secretam colagénio tipo I, proteínas não colagénicas e regulam a mineralização da matriz óssea. No processo de mineralização do tecido ósseo, aquando da calcificação da matriz extracelular, os osteoblastos vão ficando enclausurados na matriz denominando-se, então, por osteócitos. Estes localizam-se entre as camadas de osteoblastos ativos e o osso mineralizado.¹⁰ A diferenciação dos osteoblastos é estimulada por diversos fatores em fases diferentes do processo.¹² O fator de crescimento

epidérmico (EGF) é uma proteína que estimula o crescimento celular, proliferação e diferenciação celular. No caso dos osteoblastos estimula a renovação das células-estaminais mesenquimais (MSC) que são células estromais multipotentes que se podem diferenciar em osteoblastos. A pleiotrofina (PTN), que é um fator de crescimento com elevada afinidade para a heparina, estimula a atividade dos osteoblastos maduros. Existem ainda outros mensageiros, como a hormona da paratiroide (PTH), hormona do crescimento (GH), prostaglandinas e a proteína IGF-1, que estimulam a renovação das MSC e estimulam a diferenciação osteogénica.^{13,14} A via WNT é uma via de sinalização envolvida em vários processos celulares distintos e constituída por uma rede de proteínas que transmitem os sinais de recetores na superfície das células para o núcleo, onde a cascata da sinalização conduz à regulação da expressão de vários genes. A via WNT/ β -catenina associada a BMP (proteína morfogenética óssea) regula a sinalização da diferenciação osteoblástica através do fator de transcrição Runx2. A expressão de Runx2 é importante para que as MSC se diferenciem em osteoblastos.¹⁵⁻²³ Existe, ainda, outro gene, o LRP5, cujo papel na osteogénese é suportado pelo facto de as suas mutações poderem causar osteoporose-pseudogliona.^{24,25,26}

Conforme referido anteriormente, o osteócito é um osteoblasto maduro embebido na matriz óssea mineralizada, com citoplasma ligeiramente basófilo. O osteócito encontra-se enclausurado em lacunas, que apresentam prolongamentos do citoplasma formando uma rede de canálculos finos que ligam os osteócitos uns aos outros. No osso maduro, os canálculos funcionam como se fossem vias de comunicação que permitem trocas metabólicas e bioquímicas entre o sistema sanguíneo e os osteócitos. Este mecanismo permite que os osteócitos permaneçam vivos, apesar da matriz intercelular calcificada que os envolve. Este sistema de canais deixa de ser funcional, se os osteócitos se localizarem a mais de 0,5mm de um capilar, e, por este motivo, existem sistemas de harvers e os canais de Volkman que vão permitir um acesso mais facilitado dos osteócitos à rede de capilares.¹¹ Os osteócitos são muito importantes para o metabolismo ósseo, funcionando como sensores mecânicos que regulam os processos de síntese e reabsorção de osso.

Os osteoclastos são células derivadas da linhagem CD14+ de monócitos/ macrófagos, com citoplasma basófilo e granulado. Histologicamente tratam-se de células gigantes multinucleadas localizadas ao nível superficial do tecido ósseo.²⁷ Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, sendo que, num adulto saudável, existem num equilíbrio fortemente regulado com os osteoblastos, permitindo a manutenção de uma massa óssea constante.¹⁰ De uma forma simples, os osteoclastos, através da sua membrana pregueada, libertam iões hidrogénio e cloro, formando ácido clorídrico. Este vai interagir com a hidroxiapatite, dissolvendo-a, e, posteriormente, através

da ação da collagenase, catepsina K, entre outras, a matriz orgânica é degradada. Após finalização do processo de reabsorção óssea, os osteoclastos migram para outros locais ou, mais comumente, sofrem apoptose.⁹ A osteoclastogênese é dependente principalmente de duas citocinas, RANKL e M-CSF. Pensa-se que os M-CSF (fator de crescimento de monócitos) produzidos por osteoblastos e outros tipos celulares exercem efeitos parácrinos nos osteoclastos, ou seja ligam-se aos recetores existentes nos osteoclastos (ou seus precursores) e induzem a sua diferenciação. Já o RANKL (recetor ativador do fator nuclear Kappa B ligand), controla diretamente o processo de diferenciação dos osteoclastos, ativando o RANK que é uma proteína de membrana que é expressa na superfície dos osteoclastos e cuja ativação está diretamente envolvida na osteoclastogênese.²⁸⁻

31

Existe uma clara relação funcional existente entre os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos no metabolismo ósseo. Este inicia-se com a reabsorção pelos osteoclastos e é seguida de formação óssea pelos osteoblastos. Existem três fases na remodelação óssea: iniciação, transição e finalização.³² Na fase inicial, a remodelação óssea ocorre em resposta a diferentes estímulos, como a formação de microfissuras ósseas, diminuição de carga mecânica, baixos níveis de cálcio no sangue, alterações hormonais ou de citocinas. Na fase de transição, a reabsorção óssea é inibida. Os osteoclastos sofrem apoptose e os osteoblastos são recrutados e diferenciam-se.³³⁻³⁶ Já na fase terminal dá-se a formação, mineralização e entrada em função do novo osso.³⁷⁻³⁹

A formação de osso pode dar-se de duas formas: pela ossificação intramembranosa e pela ossificação endocondral.⁴⁰ A ossificação intramembranosa inicia-se dentro das membranas do tecido conjuntivo e forma os ossos frontal, parietal e partes do occipital, do temporal e dos maxilares. O início do processo dá-se com a diferenciação de células mesenquimatosas que se transformam em osteoblastos. Os osteoblastos vão sintetizar o osteíde que após se mineralizar origina a matriz óssea.⁹ A ossificação endocondral inicia-se na cartilagem hielina, e é responsável, principalmente, pela formação dos ossos curtos e longos. Em termos gerais, o processo que se dá na cartilagem hielina começa com a hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa, mineralização e posterior apoptose dos condrócitos. Após a eliminação dos condrócitos, as cavidades anteriormente ocupadas por estes são preenchidas por capilares sanguíneos e células osteogénicas. Em seguida, estas células diferenciam-se em osteoblastos que posteriormente depositarão matriz óssea na cartilagem calcificada.⁹

ROS e Antioxidantes

As ROS (espécies reativas de oxigénio) são moléculas quimicamente reativas que são constituídas por oxigénio, sendo produzidas como resultado da respiração aeróbica e oxidação de diferentes substratos.⁴¹ Nas ROS estão incluídos os radicais hidróxilo (OH); anião superóxido (O^{2-}); peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO).^{41,42} São responsáveis pela peroxidação lipídica, oxidação de enzimas e por danos oxidativos em proteínas e ácidos nucleicos.⁴¹ A sua presença em excesso tem sido considerada a causa de algumas patologias.^{43,44} As ROS são formadas por dois tipos de reações: catalisadas por enzimas ou não-enzimáticas. Podem ser de origem exógena ou endógena. Nas de origem endógena, a principal fonte é a mitocôndria, principalmente na síntese de ATP através da respiração celular.⁴² Ou seja, durante a oxidação fosforilativa, os eletrões são transportados através da cadeia respiratória mitocondrial, sendo que neste processo, e, depois de reações de oxidação-redução, se obtém o superóxido, pois os eletrões vão chegando ao oxigénio um de cada vez.^{45,46} Atualmente sabe-se que, quando a produção das ROS supera a capacidade antioxidante, podem ocorrer processos patológicos, tais como a osteoporose.⁴⁷ Como é referido em estudos recentes, a reabsorção óssea estimulada pela hormona da paratiroide e pela IL-1 demonstra que a eliminação dos aniões superóxido leva a uma inibição da reabsorção óssea, enquanto se for adicionado peróxido de hidrogénio, o processo é ativado.^{44,48}

Os antioxidantes são um tipo de defesa do organismo, protegendo-o do efeito oxidante das ROS. Existem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Como exemplos dos primeiros, temos a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Como exemplo dos não enzimáticos, temos o ácido ascórbico (Vit.C), α -tocopherol (Vit. E), glutathione (Vit. E), β -caroteno (Vit. A), licopeno, luteína e zeaxantina.⁴¹ Desta forma, a perda óssea verifica-se quando há uma diminuição da formação óssea e um aumento das ROS, que por sua vez estimula a reabsorção óssea através dos osteoclastos.⁴⁹

Osteoporose

A osteoporose é uma doença em que existe uma perda óssea considerável, tornando as fraturas ósseas mais frequentes.⁵⁰ A osteoporose ocorre quando a intensidade de reabsorção óssea ultrapassa os valores de formação óssea. As principais causas da osteoporose são, por norma, disfunções endócrinas, metabólicas e fatores mecânicos. Existem, recentemente, novas evidências que sugerem que a inflamação pode ser um fator etiológico importante no aparecimento da osteoporose.^{51,52} A ocorrência de inflamação é indicada pela presença de marcadores de inflamação, tais como várias citocinas e proteína C-reativa. Estudos bioquímicos demonstraram um aumento de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6 em doenças artríticas.^{53,54} A inflamação pode contribuir para a diminuição de massa óssea, afetando o processo de remodelação óssea, favorecendo a reabsorção óssea pelos osteoclastos, em vez da formação óssea pelos osteoblastos.^{55,56} Nas mulheres, o déficit de estrogénio, devido à menopausa, é um fator fundamental na contribuição da perda de massa óssea, com o avançar da idade. Outras causas que podem estar na origem da osteoporose podem ser um aumento da função dos osteoclastos, a cessação da atividade dos osteoblastos, bem como desequilíbrios no metabolismo do cálcio.⁵⁷

Vitamina E

A Vitamina E desempenha essencialmente funções de antioxidante no nosso organismo. Pode ser encontrada no óleo de coco, óleo de milho, azeite, óleo de soja, óleo de gérmen de trigo e óleo de palma.⁵⁸ A família desta vitamina é constituída por oito isómeros que são os α -, β -, γ -e δ -tocoferóis, bem como α -, β -, γ -e δ -tocotrienóis.^{59,60}

A vitamina E é um agente natural, de origem biológica, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que pode funcionar como fator estimulador da proliferação e maturação dos osteoblastos, protegendo as células dos efeitos prejudiciais dos radicais livres e evitando a acumulação de peróxidos.^{61,62} Apresenta-se, pois, com características anti-inflamatórias comprovadas por experiências em que Yam et al, verificaram que esta vitamina foi capaz, também, de suprimir a expressão da COX-2 que é uma enzima existente durante a inflamação.⁶³ No seguimento do anteriormente referido, também suprime a produção de várias citocinas, tais como as IL-1 e IL-6, diminuindo, dessa forma, a inflamação.⁴⁹

Segundo os estudos realizados por Muhammad, Norliza et al, a vitamina E pode ainda ajudar na manutenção da microarquitetura óssea, inibindo a osteoclastogénese e estimulando os osteoblastos a sintetizar mais tecido ósseo.⁶⁴ Deste modo, a vitamina E tem como capacidade a eliminação e neutralização dos radicais livres antes de estes desenvolverem a capacidade de ativar o fator de transcrição NFkB (responsável pela produção da interleucina-1 e interleucina-6), conforme foi observado numa experiência na qual a vitamina E tinha reduzido os níveis de várias citocinas envolvidas na reabsorção óssea. Assim, pode afirmar-se que a vitamina E impede os a inflamação causada pelos radicais livres, evitando, de certa forma, algumas etapas da patogénese da osteoporose.⁶⁵ Além disso, tem, ainda, como capacidade a regulação do metabolismo ósseo induzindo a expressão de enzimas antioxidantes que vão ter um papel fundamental na extinção das ROS do tecido e nos potenciais desequilíbrios que possam ser causados na atuação do RANKL. Segundo algumas experiências em ratos suplementados com vitamina E, verificou-se que estes apresentaram um aumento dos níveis de superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase.^{66,67} Outra forma de atuação desta vitamina, ao nível da osteoclastogénese e consequente reabsorção óssea, envolve a inibição do mecanismo que requer a interação RANK/RANKL, uma vez que este mecanismo é fundamental na diferenciação dos osteoclastos.^{68,69}

A vitamina E pode também modular o metabolismo do osso através dos seus efeitos sobre a produção de prostaglandina E2 (PGF2).^{70, 71} Ou seja, como as prostaglandinas são reguladores multifuncionais do metabolismo ósseo, quando estas se encontram em baixas concentrações levam à formação óssea.⁷² Assim sendo, a vitamina E tem a capacidade de inibir o aumento da concentração das prostaglandinas, mantendo-as em baixa concentração, levando, por isso, à formação óssea.⁷³ Por outro lado, e com esta diminuição do nível de prostaglandinas, dá-se um aumento da síntese de IGF-1.⁷⁴ Ora, sabendo que o IGF-1 aumenta a atividade osteoblástica em seres humanos, estimula-se também, desta forma, a produção óssea.^{75,76,77} Conforme referido anteriormente, a BMP-2 e o RUNX2 promovem a diferenciação dos osteoblastos e a posterior formação óssea, tal como é referido nos estudos realizados por Seham et al, em que adicionada vitamina E em ratos tratados com nicotina revelaram um aumento significativo daqueles genes mesmo na presença de nicotina a qual, normalmente, lhes induz a diminuição da expressão.⁷⁸

De acordo com os resultados de H.Xu., et al, numa experiência realizada com pintos, outro mecanismo de ação nos osteoblastos é a eliminação dos radicais livres pela vitamina E, inibindo a peroxidação de lípidos da membrana e tendo como papel manter íntegra e funcional a membrana celular das cartilagens. Desta forma, o suplemento alimentar de vitamina E aparenta regular positivamente, também, o processo de maturação e diferenciação dos condrócitos, bem como o processo de mineralização da matriz extracelular.⁷⁹ Um outro estudo que parece comprovar o efeito da vitamina E é aquele que foi realizado por Bahram H. Arjmandi et al, em que uma dose elevada de vitamina E estimula a síntese de proteínas da matriz óssea, evidenciada pelos níveis mais elevados de mRNA de osteocalcina, um marcador específico da formação óssea osteoblástica, e de IGF -I, um importante regulador local do metabolismo ósseo. Observou-se igualmente em ratinhos mais velhos o aumento do mRNA do colagénio tipo I. Deste modo, pode concluir-se que doses elevadas de vitamina E estimulam a formação óssea.⁴⁹

Vitamina C

A vitamina C (ácido ascórbico) é uma vitamina solúvel em água que tem como principal função atuar como antioxidante, eliminando de forma eficiente o anião superóxido, peróxido de hidrogénio, hipoclorito, radicais hidroxilo, radicais peróxido, protegendo, desta forma, as membranas celulares dos danos dos radicais livres.⁸⁰ O ácido ascórbico é um nutriente fundamental ao ser humano, que é produzido pelas plantas e pela maioria dos mamíferos, mas não pelo homem.^{81,82} A falta de ingestão deste nutriente leva ao escorbuto, doença que pode levar à morte do indivíduo.⁸³

A nível ósseo, tem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica envolvida na diferenciação dos osteoclastos.^{84,85} Existem estudos que têm sugerido que a vitamina C tem uma influência sobre a atuação do RANKL e a expressão do NF- κ B, afetando desta forma a diferenciação dos osteoclastos.^{86,87} O ácido ascórbico, segundo experiências efetuadas, atua de duas formas distintas, podendo estimular a osteoclastogénese ou reduzir o seu tempo de vida conduzindo à morte celular dos osteoclastos, numa fase madura.⁸⁸

O ácido ascórbico pode ativar a osteoclastogénese por duas vias, direta ou indireta. Na primeira, o aumento da osteoclastogénese provocada pela adição de ácido ascórbico é acompanhada de um aumento da atividade mitocondrial e da concentração de ATP, o que pode indicar uma ação direta do ácido por otimizar a disponibilidade do substrato durante a fosforilação oxidativa.⁸⁹ Desta forma, o ácido ascórbico atua como cofator da síntese da carnitina, a qual está envolvida no transporte de ácidos gordos para a matriz mitocondrial e posterior produção de ATP a partir da β -oxidação.^{90,91} A via indireta dá-se através do aumento do stresse oxidativo pela produção de radicais livres tais como o H_2O_2 o que induz a expressão do RANKL e a posterior formação de osteoclastos. Assim, o ácido ascórbico influencia positivamente a osteoclastogénese, funcionando como um oxidante indireto, pois promove a oxidação (catabolismo) dos lípidos.⁸⁹ Numa fase madura dos osteoclastos, o ácido ascórbico pode também atuar como antioxidante, pois com a acumulação intracelular de ROS, cria-se um ambiente mais oxidante levando à apoptose dos osteoclastos e alterando-se o metabolismo ósseo.⁹² Pode, pois, dizer-se que o ácido ascórbico induz a formação e apoptose dos osteoclastos e leva a uma redução do tempo de osteoclastogénese. Este fato foi observado numa experiência em culturas de células osteoclásticas por Motokazu Tsuneto et al em que o tempo de sobrevivência dos osteoclastos, na presença do ácido, foi de 3 dias o que indica uma forte redução da capacidade osteoclástica, visto que estes

normalmente sobrevivem 5 dias.⁸⁹ A baixa ingestão de ácido ascórbico, por norma, está associada a uma diminuição da massa óssea, apesar das maiores taxas de formação óssea.⁹³ Nas mulheres após a menopausa, um consumo elevado de ácido ascórbico leva a uma redução dos níveis dos marcadores de reabsorção óssea c-telopéptido,⁹⁴ ao invés, uma baixa ingestão de ácido ascórbico aumenta a taxa de perda óssea.⁹⁵

Com base nos estudos de Kent Urban et al, pode-se concluir que as células osteoblásticas proliferam mais lentamente na ausência do que na presença de vitamina C e que esta estimula também a produção de colagénio tipo I.⁹⁶ Está igualmente descrito que a vitamina C acelera a mineralização óssea,⁹⁷ e uma concentração adequada desta parece ser útil para melhorar a cicatrização de feridas e a regeneração óssea.⁴⁰ Assim, a deficiência de vitamina C pode inibir a formação de osso em ambos os níveis, nomeadamente ao nível da proliferação dos osteoblastos e da sua diferenciação para gerar uma matriz de osso, apresentando, por isso, um potencial de aplicabilidade em contexto de enfraquecimento do tecido ósseo, como acontece, por exemplo, na osteoporose. Ao nível da doença periodontal, existem estudos em ratos que comprovam que, com a administração de vitamina C associada com ALA (ácido alfa-lipoico), ocorre uma diminuição da inflamação periodontal e da reabsorção óssea alveolar.^{98,99,100} No estudo efetuado por Nojiri H. et al em murganhos com deficiência em SOD 1 (tipo de superóxido dismutase responsável pela dismutação do superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio), foi observado que, com a administração oral de vitamina C, houve melhorias na qualidade do tecido ósseo e regeneração do mesmo.¹⁰¹ O ácido ascórbico é também um cofator importante na hidroxilação do colagénio e é um regulador para a diferenciação dos osteoblastos^{102,103}, regulando parcialmente o fator de transcrição OSTERIX através da translocação nuclear e da ligação do Nrf1.¹⁰⁴

Pode dizer-se, portanto, que o ácido ascórbico tanto atua como agente antioxidante, como agente oxidante.^{105,106} É um antioxidante, pois o ácido ascórbico é oxidado, perdendo um eletrão para formar o ácido dehidroascórbico, que é posteriormente reduzido formando novamente o ácido ascórbico.^{107,108} Tem também sido visto como agente oxidante, uma vez que tem sido demonstrado que produz radicais livres na presença de iões metálicos,^{109,110} ou seja, pode ser visto como um dador de eletrões em sistemas biológicos, pois o seu intermediário de radical livre é pouco reativo, principalmente com o oxigénio,¹¹¹ ou então através da oxidação do ácido dehidroascórbico.^{102, 112}

Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de metabolitos secundários de plantas que compreendem as flavonas, isoflavonoides e neoflavonoides e têm, como uma das principais funções, a proteção contra o stresse oxidativo nas células.^{113,114} As isoflavonas são classificadas como fitoestrogénios e são estruturalmente semelhantes ao estrogénio, ligando-se aos recetores de estrogénio dos animais.¹¹⁵ Devido a isso, os mecanismos mais analisados têm sido as ações estrogénicas das isoflavonas as quais, através da sua capacidade de se ligar aos recetores de estrogénio, têm um efeito antioxidante e anti-inflamatório em indivíduos com elevadas concentrações de ROS, devido ao envelhecimento ou menopausa, por exemplo.^{116,117} Por outro lado, existem também trabalhos que relacionam as isoflavonas com um potencial efeito a nível ósseo. Foi observado que diferentes isoflavonas podem inibir a osteoclastogénese, através de diferentes formas. Por exemplo, podem atuar indiretamente no processo através dos osteoblastos, inibindo a expressão do RANKL, em resposta à diminuição do TNF e COX-2,^{118,119} ou então através da eliminação das ROS, inibindo a expressão do gene Runx2 e posterior ativação dos osteoclastos.^{120, 121}

A genisteína, a isoflavona mais comum, estimula a diferenciação e mineralização dos osteoblastos bem como a sua síntese proteica. Para além destes efeitos ao nível osteoblástico, inibe a osteoclastogénese e induz a apoptose dos osteoclastos maduros através da regulação do eixo RANKL/ RANK/ NF-KB.^{122, 123} Mais concretamente, atua ao nível das principais proteínas da via NF-KB, as RANKL, RANK e OPG, envolvidas na formação dos osteoclastos. A interação RANKL/RANK ativa os osteoclastos, enquanto a OPG, produzida principalmente por osteoblastos, boqueia essa interação, inibindo a reabsorção óssea e induzindo ainda a apoptose dos osteoclastos. Assim sendo, e como demonstrado em estudos recentes, a genisteína estimula a produção de OPG nas células osteoblásticas¹²⁴ inibindo a reabsorção óssea.¹²⁵ Outra forma de ação atribuída à genisteína envolve a inibição da TNF α , um fator que induz a osteoclastogénese, bem como a supressão da expressão do c-Fos e NFATc1, fatores de transcrição com um papel central na reabsorção óssea.¹²⁶ A genisteína é também um conhecido inibidor da tirosina-cinase¹²⁷ que é uma enzima que transfere o grupo fosfato do ATP para a proteína e que se apresenta como crucial na proliferação e diferenciação celular. Por exemplo, os osteoclastos são regulados pela fosforilação dos componentes da sua membrana, um processo que envolve a tirosina-cinase.¹²⁸ Em estudos feitos por Blair et al em aves, foi observado que a genisteína inibiu não só a reabsorção óssea ao nível da atuação da tirosina-cinase, como também no processo de produção e secreção de

ácido clorídrico pelos osteoclastos.¹²⁹ Os recetores de estrogénio podem ser de dois tipos $Er\alpha$ e $Er\beta$. A sua localização difere, pois os $Er\alpha$ encontram-se no osso cortical e os $Er\beta$ encontram-se no osso esponjoso. Existe um papel fundamental destes recetores de estrogénio na diferenciação das células ósseas.^{130, 131} Verificou-se que a genisteína aumenta a expressão dos $Er\beta$ e, ao ligar-se às células osteoblásticas através desse mecanismo, leva a uma estimulação da produção de OPG.¹²⁵ Existem estudos recentes que indicam que a acumulação de gordura tem um efeito negativo sobre o tecido ósseo.¹³² Os adipócitos e os osteoblastos derivam de células estaminais mesenquimais comuns entre si, podendo então a adipogénese levar a uma diminuição da osteogénese em casos de obesidade. Adicionalmente, também se sabe que a diminuição da osteoblastogénese associada ao envelhecimento pode levar a um aumento da adipogénese.¹³³ Desta forma, tem sido alvo de pesquisa formas de inibição da adipogénese para estimular a osteogénese. Heim et al observaram que a genisteína promove a diferenciação osteogénica enquanto inibe a adipogénese, pela supressão dos PPARs (peroxisome proliferator- activated receptors)¹³⁴ que são recetores responsáveis pela estimulação da adipogénese e inibição da osteogénese.¹³⁵

A daidzina, outro tipo de flavonoide, tem sido, também, estudada neste contexto, e parece ter um efeito anabólico, no metabolismo ósseo, idêntico ao da genisteína.¹³⁶ Num estudo de De Wilde et al em porcos, verificou-se que quando os animais eram suplementados com daidzina, havia um aumento da diferenciação dos osteoblastos e da secreção de OPG e RANKL, bem como uma mineralização do osso mais acentuada.¹³⁷

O campferol pertence ao grupo de flavonoides encontrados nos brócolos, cebolas e couves, e tem como efeitos reconhecidos a diminuição da reabsorção óssea pelos osteoclastos, promoção da diferenciação e mineralização de células pró-osteoblástica e, ainda, um aumento de fosfatase alcalina.¹³⁸ Num estudo de Eun Mi Choi, em células osteoblásticas MC3T3-E1, foi comprovado que a utilização de campferol aparenta ser benéfico para o metabolismo ósseo.^{139, 140} Comprovado em vários estudos existentes, como por exemplo, o efetuado por Maggio et al, a quantidade de antioxidantes existentes no plasma de mulheres com osteoporose é bastante baixa relativamente as mulheres saudáveis.¹⁴¹ De facto, um desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes aparenta ser um importante fator na patogénese da osteoporose pré-menopausa.¹⁴² Desta forma, pode concluir-se que o campferol poderá ter uma função protetora dos osteoblastos, eliminando as ROS.¹³⁹

A icariin, outra isoflavona importante, aumenta a capacidade de diferenciação e mineralização dos osteoblastos. Che et al, numa experiência com ratos, observaram que após adição de icariina, a proliferação de BMSC (células estromais da medula óssea), a atividade da

ALP, a secreção de osteocalcina e a deposição de cálcio nas BMSC eram estimuladas.¹⁴³ Outro estudo de Sheng et al, em culturas osteogénicas, revelou que, para além do referido anteriormente, ocorria também o aumento dos níveis de Runx2, OSTERIX, BMP2 e IGF-1.¹⁴⁴ Pensa-se ainda que a icariina inibe a formação de osteoclastos induzida pelo RANKL e M-CSF e inibe a reabsorção óssea dos osteoclastos maduros pela indução da sua apoptose.¹⁴⁵ Existe um estudo de Tsai-Pei Hsieh et al, efetuado em ratos adultos, onde foi descrito que a icariina atua sobre os osteoblastos de forma a promover a diferenciação celular e a aumentar a produção de ALP, NO, a mineralização osteoblástica e também a diminuição dos níveis de Caspase-3, responsável pela apoptose dos osteoblastos.¹⁴⁶ Neste contexto, convém referir que o óxido nítrico tem sido visto como um possível regulador local do metabolismo ósseo. Assim sendo, o óxido nítrico tem um efeito supressor sobre a reabsorção óssea através da inibição da atividade dos osteoclastos ou pelo recrutamento dos precursores associados com a atividade iNos.¹⁴⁷

O dióspiro é uma espécie de planta nativa da China e é usado tradicionalmente para muitos fins medicinais, por exemplo no tratamento de paralisia, queimaduras e na hemóstase. As folhas de dióspiro contêm oligómeros de flavonoides, particularmente as catequinas, campferol e quercetina que possuem capacidades antioxidantes, removendo radicais de oxigénio e quelantes de metal.^{148,149} Em estudos feitos por Lijun Sun et al, em culturas de células osteoblásticas MC3T3-E1, foi demonstrada a capacidade dos flavonoides extraídos de folhas de diósipiros na eliminação do superóxido e radicais hidróxilo. Ainda neste estudo, é demonstrada a capacidade da redução acentuada na produção de ROS e MDA e ainda um aumento do nível da atividade da SOD, catalase, e GSH, o que sugere um efeito protetor dos flavonoides ao nível ósseo.¹⁵⁰

O resveratrol, outro flavonoide, é encontrado principalmente nas uvas e amoras e parece ter funções antioxidantes entre outras.¹⁵¹ O resveratrol pode ser benéfico para o metabolismo ósseo pela estimulação da AMPK que assim vai estimular a diferenciação e proliferação dos osteoblastos, ao mesmo tempo que leva a uma menor produção de RANKL, inibindo a reabsorção óssea.¹⁵² Outra forma do resveratrol influenciar o metabolismo ósseo passa pela ativação do SIRT1, uma enzima que contribui para a regulação celular e diminui o desenvolvimento dos adipócitos através da inibição dos PPARs, promovendo, desta forma, a diferenciação dos osteoblastos.¹⁵³ Outra forma alternativa de atuação envolve a ativação do recetor de estrogénios o que leva à proliferação e diferenciação dos osteoblastos.¹⁵⁴

Carotenoides

Os carotenoides encontram-se em legumes e frutas e podem ser divididos em carotenos e xantofilas, sendo que alguns são os precursores da síntese da vitamina A em animais.^{155, 156, 157} São antioxidantes com várias funções fisiológicas, havendo vários estudos que sugerem um envolvimento de alguns carotenoides ao nível do metabolismo ósseo.

Por exemplo, a β -criptoxantina é do tipo xantofila e tem sido demonstrado, em vários estudos, a sua eficácia na estimulação da diferenciação de osteoblastos e na inibição da reabsorção óssea.^{158, 159} A β -criptoxantina aparenta estimular a expressão de genes para proteínas que estão ligadas à formação e mineralização óssea nas células osteoblásticas, como foi observado no estudo de Uchiyana S. et al, em ratos, onde houve uma estimulação da expressão do mRNA de IGF-1 e TGF- β 1 em células osteoblásticas.¹⁶⁰ Ainda num outro estudo de Uchiyana S. et al, em células osteoblásticas MC3T3-E1, observou-se que a presença de β -criptoxantina induzia um aumento da expressão de mRNA de Runx2, colagénio tipo I e fosfatase alcalina.¹⁶¹ Nos osteoclastos, a β -criptoxantina parece ter um efeito inibidor na sua formação, através da inibição da produção de RANKL, como é confirmado nas observações de Uchiyama S. et al, em células de medula óssea de ratos.¹⁶² Ainda outra atividade da β -criptoxantina nos osteoclastos é a indução da sua apoptose, pois, quando se encontra presente, verifica-se um aumento da atividade da caspase-3, responsável pela apoptose celular.¹⁶³

O licopeno é um potente antioxidante que pode ser encontrado principalmente em tomates e tem sido estudado ao nível da sua potencial capacidade de combater a osteoporose. Tem sido demonstrado que o licopeno inibe a produção de ROS, bem como a diferenciação osteoclástica, para além de estimular a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e a atividade da fosfatase alcalina nos mesmos.^{164, 165, 166} Num estudo de L. G. Rao et al, em mulheres pós-menopausa às quais foi administrado licopeno, é concluído que existe uma correlação significativa entre a ingestão do licopeno e a diminuição da reabsorção óssea, sendo que esta pode ser explicada pela capacidade do licopeno diminuir o stresse oxidativo existente nas mulheres estudadas.¹⁶⁷ Nesse contexto, foi demonstrado que o licopeno apresenta, em estudos em animais, uma capacidade significativa de reduzir a peroxidação lipídica.^{168, 169} Em estudos feitos por Mackinnon et al, foi verificado que, após um mês de restrição de licopeno, houve uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) e um aumento dos níveis séricos de NTx (marcador da reabsorção óssea) o que sugere a ação benéfica do licopeno no metabolismo ósseo.¹⁷⁰

O licopeno aparenta também estimular a proliferação e diferenciação de osteoblastos através da elevação da atividade da ALP.¹⁷¹

Um outro carotenoide conhecido é a fucoxantina, que é produzida por algas marinhas e tem sido alvo de estudos devido ao seu efeito na supressão da diferenciação dos adipócitos, efeito anti-mutagénico, anti-inflamatório ocular e prevenção de alguns cancros.^{172, 173, 174, 175} Num estudo de Swadesh K. Das. Et al com células macrófagas RAW264.7, a fucoxantina suprimiu a diferenciação das células em osteoclastos e induziu a apoptose destas através da ativação da caspase-3. Em paralelo, não se verificaram alterações ao nível da viabilidade das células osteoblásticas.¹⁷⁶

Conclusão

Como foi descrito anteriormente, pode concluir-se que os antioxidantes possuem uma potencial capacidade de afetar o metabolismo ósseo, apesar dos mecanismos subjacentes não se encontrarem ainda totalmente caracterizados. Os efeitos estudados nesta revisão assentaram basicamente na influência direta ou indireta dos antioxidantes nos osteoblastos e osteoclastos. Esta influência pode ser verificada pela indução da osteoblastogénese que leva à formação óssea; pela inibição da osteoclastogénese de uma forma direta o que diminui, assim, a reabsorção óssea; e também pela redução dos níveis de mediadores inflamatórios, os quais influenciam indiretamente o metabolismo ósseo. Assim sendo, uma vez que na sua maioria se tratam de substâncias naturais de fácil acesso, os antioxidantes podem ser um elemento importante para minimizar ou até prevenir alguns problemas ósseos que tanto afetam a vida normal das pessoas.

Referências bibliográficas

- 1-Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. UK. Oxford Univ. Press, 2007.
- 2- Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. Sports Med. 2006; 36:327–358.
- 3- Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. Endocr Rev. 2010; 31: 266–300.
- 4- Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. Sports Med. 1996; 21: 213–238.
- 5- Regulska M, Leskiewicz M, Budziszewska B et al. Inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and its low-calcemic analogues on staurosporine-induced apoptosis. Pharmacol Rep. 2007; 59: 393–401.
- 6- Clarke BL, Khosla S. Physiology of bone loss. Radiol Clin North Am. 2010; 48: 483–495
- 7- Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. Curr Pharm Des. 2009; 15: 3063–3073.
- 8- Ralston SH. Structure and metabolism of bone. Medicine, 2005 Dec; 33(12): 58– 60.
- 9- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.
- 10- Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of Bone Biology. Academic Press, 1996.
- 11- Robert EM, Arun KG. Implant Dentistry. 1998; 7 (4): 267-276.
- 12- Bonyadi M, Waldman SD, Lui D, et al. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly- 6A null mice. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:5840–5.
- 13- Yang XB, Roach HI, Clarke NMP, et al. Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. Bone 2001; 29:523–31.
- 14- Tare RS, Oreffo ROC, Clarke NMP, et al. Pleiotrophin/osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation. J Bone Miner Res 2002; 17:2009–20.

- 15- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signaling in mice. *Nature*. 2000; 407:535–8.
- 16- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20:781–810.
- 17- Brault V, Moore R, Kutsch S, et al. Inactivation of the b-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 2001; 128:1253–64.
- 18- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, et al. Wnt/bcatenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*. 2005; 8: 739–50.
- 19- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997; 89:747–54.
- 20- Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997; 89:755–64.
- 21- Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89:765–71.
- 22- Kato M, Patel MS, Levasseur R. et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2002; 157:303–14.
- 23- Kundu M, Javed A, Jeon JP et al. Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nat Genet*. 2002; 32:639–44.
- 24- Miller J, Horner A, Stacy T, et al. The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation. *Nat Genet*. 2002; 32:645–9.
- 25- Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, et al. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*. 2000; 407:527–30.
- 26- Gong Y, Slee RB, Fukui N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 2001; 107:513–23.

- 27- Bonucci E. New knowledge on the origin, function and fate of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res.* 1981; 158: 252-261.
- 28- Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93:165–76.
- 29- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:3597–602.
- 30- Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, et al. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:4828– 32.
- 31- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990; 345:442–4.
- 32- Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May. 15; 473(2):201-9.
- 33- Vignery A, Baron R. *Anat. Rec.* 1980; 196: 191–200.
- 34- Van PTV, Vignery A, Baron R. *Anat Rec.* 1982; 202: 445–451.
- 35- Van PTV, Vignery A, Baron R, *Cell Tissue Res.* 1982; 225: 283–292.
- 36- Domon T, Suzuki R, Takata K, Yamazaki Y, Takahashi S, Yamamoto T, Wakita M, *Ann. Anat.* 2001; 183: 103–110.
- 37- Logan CY, Nusse R. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2004; 20: 781–810.
- 38- Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO, *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 21162–21168.
- 39- Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G, *Dev. Cell.* 2005; 8: 751–764.
- 40- Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: Condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* 2000; 22: 138-147.
- 41- José MM, Cristina PG, Ignacio NC. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry.* 1999 Nov; 32(8): 595-603.

- 42- Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*. 2004 Apr; 7(2):97-110.
- 43- Chopra S, Wallace HM. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*. 1998 Abr; 55(7): 1119–1123
- 44- Urao N, Fukai MU. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med*. 2013 Jan; 54:26-39.
- 45- Staniek K, Gille L, Kozlov AV, Nohl H. Mitochondrial superoxide radical formation is controlled by electron bifurcation to the high and low potential pathways. *Free Radic Res*. 2002 Abr; 36 (4): 381–387
- 46- Saybasili H, Yuksel M, Haklar G, Yalcin AS. Effect of mitochondrial electron transport chain inhibitors on superoxide radical generation in rat hippocampal and striatal slices. *Antioxid Redox Signal*. 2001 Dec; 3(6): 1099–1104
- 47- Smietana MJ, Arruda EM, Faulkner JA, Brooks SV, Larkin LM. Reactive oxygen species on bone mineral density and mechanics in Cu, Zn superoxide dismutase (Sod1) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Dec; 403(1):149-53.
- 48- Kim HJ, Chang EJ, Kim HM, Lee SB, Kim HD, Kim GS, Kim HH. Antioxidant α -lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor- κ B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and tumor necrosis factor- α . *Free Radic Biol Med*. 2006 May; 40(9):1483-93.
- 49- Arjmandi BH, Juma S, Beharka A, Bapna MS, Akhter M, Meydani SN. Vitamin E improves bone quality in the aged but not in young adult male mice. *J Nutr Biochem*. 2002 Sep; 13(9):543.
- 50- Doran PM, Khosla S. “Osteoporosis,” in *Contemporary*. Totowa: Humana Press; 2003.
- 51- Yun AJ, Lee PY. Maldaptation of the link between inflammation and bone turnover may be a key determinant of osteoporosis. *Medical Hypotheses*. 2004; 63(3):532–537.
- 52- Mitra D, Elvins DM, Speden DJ, Collins AJ. The prevalence of vertebral fractures in mild ankylosing spondylitis and their relationship to bone mineral density. *Rheumatology*. 2000; 39(1):85–89.

- 53- Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel diseases and relates to the state of bone loss. *Gut*. 2005; 54(4):479–487.
- 54- Saidenberg-Kermanac'h N, Cohen-Solal M, Bessis N, De Vernejoul MC, Boissier MC. Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Joint Bone Spine*. 2004; 71(1):9–13.
- 55- Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *Journal of Clinical Investigation*. 2000; 106(6):749–752.
- 56- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000; 289(5484):1504–1508.
- 57- Parfitt AM. “Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: implications for the understanding of osteoporosis,” in *Osteoporosis*. 2ed. San Diego: Academic Press; 2000.
- 58- Ahmad NS, Khalid BAK, Luke DA, Ima Nirwana S. Tocotrienol offers better protection than tocopherol from free radical-induced damage of rat bone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32:661–770.
- 59- Norazlina M, Chua CW, Ima-Nirwana S. Vitamin E deficiency reduced lumbar bone calcium content in female rats. *Medical Journal of Malaysia*. 2004; 59(5):623–630.
- 60- Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radical Biology and Medicine*. 1991; 10(5):263–275.
- 61- Renò F, Aina V, Gatti S, Cannas M. Effect of vitamin E addition to poly(d,l)-lactic acid on surface properties and osteoblast behaviour. *Biomaterials*. 2005 Oct; 26(28):5594-9.
- 62- Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr*. 1990; 10:357-82.
- 63- Yam ML, Abdul Hafid SR, Cheng HM, Nesaretnam K. Tocotrienols suppress proinflammatory markers and cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 macrophages. *Lipids*. 2009; 44(9):787–797.
- 64- Muhammad N, Luke DA, Shuid AN, Mohamed N, Soelaiman IN. Two Different Isomers of Vitamin E Prevent Bone Loss in Postmenopausal Osteoporosis Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012:161527.

- 65- Ahmad NS, Khalid BAK, Luke DA, Nirwana SI. Tocotrienol offers better protection than tocopherol from free radical-induced damage of rat bone. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2005; 32(9):761–770.
- 66- Maniam S, Mohamed N, Shuid AN, Soelaiman IN. Palm tocotrienol exerted better antioxidant activities in bone than α -tocopherol. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2008; 103(1):55–60.
- 67- Lee S-P, Mar GY, Ng LT. Effects of tocotrienol-rich fraction on exercise endurance capacity and oxidative stress in forced swimming rats. *European Journal of Applied Physiology*. 2009; 107(5):587–595.
- 68- Lee JH, Kim HN, Yang D, et al. Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(20):13725–13734.
- 69- Ha H, Lee JH, Kim HN, Lee ZH. α -Tocotrienol inhibits osteoclastic bone resorption by suppressing RANKL expression and signaling and bone resorbing activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 406(4):546–551.
- 70- Xu H, Watkins BA, Seifert MF. Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry. *Calcif Tissue Int*. 1995 Oct; 57(4):293-300.
- 71- Watkins BA, Shen CL, McMurtry JP, Xu H, Bain SD, Allen KGD, Seifert MF. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E2 production, insulin-like growth factor-1 concentration and formation rate in chicks. *J Nutr*. 1997 Jun; 127(6):1084-91.
- 72- Raisz LG. Bone cell biology new approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec; 8 Suppl 2:S457-65.
- 73- Meydani SN, Meydani M, Verdon CP, Shapiro AA, Blumberg JB, Hayes KC. Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E2 synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mech Ageing Dev*. 1986 Apr; 34(2):191-201.
- 74- Hakeda Y, Harada S, Matsumoto T, Tezuka K, Higashino K, Kodama H, Hashimotogoto T, Ogata E, Kumegawa M. Prostaglandin F2a stimulates proliferation of clonal osteoblastic MC3T3–E1 cells by up-regulation of insulin-like growth factor-1 receptors. *J Biol Chem*. 1991 Nov 5; 266(31):21044-50.

- 75- Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F, Chihara K. Serum levels of Insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein (IGFBP)-2, and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures. *J Bone Miner Res.* 1997 Aug; 12(8):1272-9.
- 76- Kalu DN, Arjmandi BH, Liu CC, Salih MA, Birnbaum RS. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone Miner.* 1994 May; 25(2):135-48.
- 77- Fukuda R, Usuki S, Mukai N, Amagai H, Hayashi K, Takamatsu K. Serum insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, sex steroids, osteocalcin and bone mineral density in male and female rats. *Gynecol Endocrinol.* 1998 Oct; 12(5):297-305.
- 78- Abukhadir SS, Mohamed N, Makpol S, Muhammad N. Effects of Palm Vitamin E on Bone-Formation-Related Gene Expression in Nicotine-Treated Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012:656025.
- 79- Xu H, Watkins BA, Seifert MF. Vitamin E Stimulates Trabecular Bone Formation and Epiphyseal Cartilage Morphometry. *Calcif Tissue Int.* 1995 Oct; 57(4):293-300.
- 80- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Biochem J.* 1993; 215: 213–219.
- 81- Burns JJ, Peyser P, Moltz A. Missing step in guinea pigs required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Science.* 1956 Dec 7; 124(3232):1148-9.
- 82- Chatterjee ML, De MS. Adrenal ascorbic acid content of rats after different rauwolfia alkaloids. *Bull Calcutta Sch Trop Med.* 1969 Jan; 17(1):15-6.
- 83- Irwin MI, Hutchins BK. A conspectus of research on vitamin C requirements of man. *J Nutr.* 1976 Jun; 106(6):821-79.
- 84- Tintut Y, Parhami F, Tsingotjidou A, Tetradis S, Territo M, Demer LL. 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFκB ligand (RANKL)-dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19; 277(16):14221-6.
- 85- Sonmez M, Turk G, Yuce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone level of male Wister rats. *Theriogenology.* 2005 Apr 15; 63(7):2063-72.

- 86- Xiao XH, Liao EY, Zhou HD, Dai RC, Yuan LQ, Wu XP. Ascorbic acid inhibits osteoclastogenesis of RAW264.7 cells induced by receptor activated nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in vitro. *J Endocrinol Invest*. 2005 Mar; 28(3):253-60.
- 87- Takarada T, Hinoi E, Kambe Y, Sahara K, Kurokawa S, Takahata Y et al. Osteoblast protects osteoclast devoid of sodium-dependent vitamin C transporters from oxidative cytotoxicity of ascorbic acid. *Eur J Pharmacol*. 2007 Dec 1; 575(1-3):1-11.
- 88- Nihouannen D, Barralet JE, Fong JE, Komarova SV. Ascorbic acid accelerates osteoclast formation and death. *Bone*. 2010 May; 46(5):1336-43.
- 89- Tsunetoa M, Yamazakia H, Yoshinoa M, Yamadaa T, Hayashia SI. Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 7; 335(4):1239-46.
- 90- Dunn WA, Rettura G, Seifter E, Englard S. Carnitine biosynthesis from gamma-butyrobetaine and from exogenous protein-bound 6-N-trimethyl-l-lysine by the perfused guinea pig liver. Effect of ascorbate deficiency on the in situ activity of gamma-butyrobetaine hydroxylase. *J Biol Chem*. 1984 Sep 10; 259(17):10764-70.
- 91- Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr*. 1991 Dec; 54(6 Suppl):1147S-1152S.
- 92- Oursler MJ, Bradley EW, Elfering SL, Giulivi C. Native, not nitrated, cytochrome c and mitochondria-derived hydrogen peroxide drive osteoclast apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jan; 288(1):C156-68.
- 93- Kipp DE, Grey CE, McElvain ME, Kimmel DB, Robinson RG, Lukert BP. *J Nutr*. 1996; 126:2044–2049.
- 94- Pasco JA, Henry MJ, Wilkinson LK, Nicholson GC, Schneider HG, Kotowicz MA. *J Women's Health (Larchmt)* 2006; 15:295–300.
- 95- Kaptoge S, Welch A, McTaggart A, Mulligan A, Dalzell N, Day NE, Bingham S, Khaw KT, Reeve J. *Osteoporos Int*. 2003; 14:418–428.
- 96- Urban K, Höhling HJ, Lüttenberg B, Szuwart T, Plate U. An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E. *Head Face Med*. 2012 Sep 28; 8:25.

- 97- Otsuka E, Yamaguchi A, Hirose S, Hagiwara H. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *Am J Physiol*. 1999; 277(1 Pt 1):C132–C138.
- 98- Lee EY, Lee CK, Lee KU, et al. Alpha-lipoic acid suppresses the development of collagen induced arthritis and protects against bone destruction in mice. *Rheumatol Int*. 2007; 27:225-233.
- 99- Heitzer T, Finckh B, Albers S, Krohn K, Kohlschütter A, Meinertz T. Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: Relation to parameters of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31:53-61.
- 100- Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, et al. Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46:163-168.
- 101- Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Kobayashi K, Tsuda C, Miyazaki T et al. Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking. *J Bone Miner Res*. 2011 Nov; 26(11):2682-94.
- 102- Park JB, Levine M. Purification, cloning, and expression of dehydroascorbic acid reduction activity from human neutrophils. Identification as glutaredoxin. *Biochem J*. 1996 May 1; 315 (Pt 3):931-8.
- 103- Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr*. 1991 Dec; 54(6 Suppl):1135S-1140S.
- 104- Xing W, Singgih A, Kapoor A, Alarcon CM, Baylink DJ, Mohan S. 2007 *J. Biol. Chem*. 282; 22052–22061.
- 105- Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug; 86(16):6377-81.
- 106- Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem. Pharmacol*. 1992; 44: 1905–1915.
- 107- Takarada T, Hinoi E, Kambe Y, Sahara K, Kurokawa S, Takahata Y et al. Osteoblast protects osteoclast devoid of sodium-dependent vitamin C transporters from oxidative cytotoxicity of ascorbic acid. *Eur J Pharmacol*. 2007 Dec 1; 575(1-3):1-11.

- 108- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 22; 104(21):8749-54.
- 109- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*. 1999 Jun; 13(9):1007-24.
- 110- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003 Feb; 22(1):18-35.
- 111- Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Feb 1; 300(2):535-43.
- 112- Welch RW, Wang Y, Crossman Jr A, Park JB, Kirk KL, Levine M. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J Biol Chem*. 1995 May 26; 270(21):12584-92.
- 113- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol*. 2001 Jun; 126(2):485-93.
- 114- Field TS, Lee DW, Holbrook NM. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol*. 2001 Oct; 127(2):566-74.
- 115- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor- β . *Endocrinology*. 1998; 139: 4252 – 63.
- 116- Chen JR, Badger TM, Nagarajan S, Ronis MJ. Inhibition of reactive oxygen species generation and downstream activation of the ERK/STAT3/RANKL-signaling cascade to osteoblasts accounts for the protective effect of estradiol on ethanol-induced bone loss. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324: 50 – 9.
- 117- Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart S, et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*. 2007; 282: 27285 – 97.
- 118- Bu SY, Hunt TS, Smith BJ. Dried plum polyphenols attenuate the detrimental effect of TNF α on osteoblast function coincident with up-regulation of Runx2, Osterix and IGF-1. *J Nutr Biochem*. 2009; 120: 35 – 44.

- 119- Bu SY, Lerner M, Stoecker BJ, Boldrin E, Brackett DJ, Lucas EA, Smith BJ. Dried plum polyphenols inhibit osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 and inflammatory mediators. *Calcif Tissue Int.* 2008; 82: 475 – 88.
- 120- He X, Andersson G, Lindgren U, Li Y. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 265.7 cells through inhibition of ROS production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Oct 22; 401(3):356-62.
- 121- Tseng PC, Hou SM, Chen RJ, Peng HW, Hsieh CF, Kuo ML, Yen ML. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating Runx2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A Axis. *J Bone Miner Res.* 2011 Oct;26(10):2552-63.
- 122- Reinwald S, Weaver CM. Soy isoflavones and bone health: A double-edged sword? *J Nat Prod.* 2006; 69:450–459.
- 123- Sugimoto E, Yamaguchi M. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med.* 2000; 5:515–520.
- 124- Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: Evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology.* 2001; 142:3632–3637.
- 125- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lothy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89:309–319.
- 126- Karieb S, Fox SW. Zinc modifies the effect of phyto-oestrogens on osteoblast and osteoclast differentiation in vitro. *Br J Nutr.* 2012; 31:1–10.
- 127- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987; 262:5592–5595.
- 128- Brynin R. Soy and its isoflavones: A review of their effects on bone density. *Altern Med Rev.* 2002; 7:317–327.
- 129- Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem.* 1996; 61:629–637.

- 130- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:5925–5930.
- 131- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:2309–2314.
- 132- Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res*. 2011; 6:30.
- 133- Gimble JM, Nuttall ME. The relationship between adipose tissue and bone metabolism. *Clin Biochem*. 2012; 45:874–879.
- 134- Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, Hunziker W, Weber P, Martin I, Bendik I. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology*. 2004; 145:848–859.
- 135- Kawai M, Rosen CJ. PPAR γ : A circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2010; 6:629–636.
- 136- Gao YH, Yamaguchi M. Anabolic effect of daidzein on cortical bone in tissue culture Comparison with genistein effect. *Mol Cell Biochem*. 1999; 194: 93–98
- 137- De Wilde A, Lieberherr M, Colin C, Pointillart A. A low dose of daidzein acts as an ER β -selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. *J. Cell. Physiol*. 2004; 200:253–262.
- 138- Pang, JL, Ricupero, DA, Huang, S, et al. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71: 818–826.
- 139- Choi EM. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. *Food Chem Toxicol*. 2011 Aug; 49(8):1800-5.
- 140- Dröse S, Brandt U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem*. 2008; 283: 21649–21654
- 141- Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol. Int*. 2008; 28: 317–321.
- 142- Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2003; 88: 1523–1527.

- 143- Chen KM, Ge BF, Ma HP, Liu XY, Bai MH, Wang Y. Icariin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells. *Pharmazie*. 2005; 60:939–942.
- 144- Sheng H, Zhang G, Wang X, Lee K, Yao X, Leung K, Li G, Qin L. Phytochemical molecule icariin stimulates osteogenic but inhibits adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Bone*. 2008; 43:S42–S43.
- 145- Nian H, Ma MH, Nian SS, Xu LL. Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. *Phytomedicine*. 2009; 16:320–326.
- 146- Hsieha TP, Sheua SY, Sunb JS, Chend MH, Liua MH. Icariin isolated from *Epimedium pubescens* regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression *Phytomedicine*. 2010; 17(6): 414–423.
- 147- Aguirre J, Buttery L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Marticorena IF, Hukkanen M, Huang P, MacIntyre I, Polak J. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am. J. Pathol*. 2001; 158: 247–257
- 148- Matsuo T, Ito S. The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki*). *Agricultural and Biological Chemistry*. 1978; 42: 1637–1643
- 149- Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Higa S, Wang W, Suemura M, Kishimoto T, Tanaka T. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul; 106(1 Pt 1):159-66.
- 150- Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol*. 133- 2011 Oct; 49(10):2689-96.
- 151- Finkel T. Ageing: a toast to long life. *Nature*. 2003; 425: 132–133.
- 152- Lee YS, Kim YS, Lee SY, Kim GH et al. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone*. 2010 Nov; 47(5):926-37.
- 153- Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, Haldosen LA. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189: 93–97.

- 154- Dai Z, Li Y, Quarles LD, Song T et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine*. 2007 Dec; 14(12):806-14.
- 155- Williams JA, Kondo N, Okabe T, Takeshita N, Pilchak DM, Koyama E et al. Retinoic acid receptors are required for skeletal growth, matrix homeostasis and growth plate function in postnatal mouse. *Dev Biol*. 2009; 328:315–327.
- 156- Park CK, Ishimi Y, Ohmura M, Yamaguchi M, Ikegami S. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1997; 43:281–296.
- 157- Conaway HH, Persson E, Halén M, Granholm S, Svensson O, Pettersson U, Lie A, Lerner UH. Retinoids inhibit differentiation of hematopoietic osteoclast progenitors. *FASEB J*. 2009; 23:3526–3538.
- 158- Yamaguchi M, Uchiyama S. Effect of carotenoid on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro: the unique anabolic effect of β -cryptoxanthin. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26:1188–1191.
- 159- Yamaguchi M, Uchiyama S. β -Cryptoxanthin stimulates bone formation and inhibits bone resorption in tissue culture in vitro. *Mol Cell Biochem*. 2004; 258:137–144.
- 160- Uchiyama S, Yamaguchi M. β -Cryptoxanthin stimulates cell proliferation and transcriptional activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med*. 2005; 15:675–681.
- 161- Uchiyama S, Yamaguchi M. β -Cryptoxanthin stimulates cell differentiation and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem*. 2005; 95:1224–1234.
- 162- Uchiyama S, Yamaguchi M. Inhibitory effect of β -cryptoxanthin on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67:1297–1305
- 163- Uchiyama S, Yamaguchi M. β -Cryptoxanthin stimulates apoptotic cell death and suppresses cell function in osteoclastic cells: Change in their related gene expression. *J Cell Biochem*. 2006; 98:1185–1195.
- 164- Rao L, Krishnadev N, Banasikowska K, Rao A. Lycopene I—effect of osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. *J Med Food*. 2003; 6(2):69–78.

- 165- Kim L, Rao AV, Rao LG. Lycopene II—effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. *J Med Food*. 2003; 6(2):79–86.
- 166- Park CK, Ishimi Y, Ohmura M, Yamaguchi M, Ikegami S. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. *J Nutr Sci and Vitaminol*. 1997; 43(3):281–296.
- 167- Rao LG, Mackinnon ES, Josse EG, Murray TM, Strauss A, Rao AV. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2007 Jan; 18(1):109-15.
- 168- Rao AV, Agarwal S. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr Cancer*. 1998; 31(3):199-203.
- 169- Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*. 1998; 33(10):981–984.
- 170- Mackinnon ES, Rao AV, Rao LG. Dietary restriction of lycopene for a period of one month resulted in significantly increased biomarkers of oxidative stress and bone resorption in postmenopausal women. *J Nutr Health Aging*. 2011; 15: 133–138.
- 171- Kim L, Rao AV, Rao LG. Lycopene II—effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. *J Med Food*. 2003; 6: 79–86.
- 172- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Takahashi N, Kawada T, Miyashita K. Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells *Int. J. Mol. Med*. 2006; 18: 147– 152.
- 173- Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, Satomi Y. Cancer prevention by natural carotenoids. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Mar 15; 483(2):165-8.
- 174- Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, Jin XH, Koyama Y, Miyashita K, Yoshida K, Kase S, Ohno S. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo *Exp. Eye Res*. 2005; 81: 422– 428.

175- Das SK, Hashimoto T, Baba M, Nishino H, Komoto A, Kanazawa K. Japanese kelp (kombu) extract suppressed the formation of aberrant crypt foci in azoxymethane challenged mouse colon. J. Clin. Biochem. Nutr. 2006; 38: 119– 125.

176- Huh YJ, Kim JM, Kim H, Song H, So H, Lee SY et al. Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. Cell Death Differ. 2006; 13: 1138–1146.

ANEXOS

ANEXO 1

DECLARAÇÃO

Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

28/05/2013

O/A investigador (a)

ANEXO 2

PARECER

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo Estudante Bruno Samuel Azevedo da Silva Carvalho, com o título: "Influência dos antioxidantes na regeneração óssea", está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

28/ 05/ 2013

O Orientador

